Efecto de la concentración y tiempo de reacción sobre la actividad catalítica de la enzima α-amilasa

Castillo-Meléndez, Antony[1]; García-Carrillo, Brenda[1]; Madrigal-Solano, Jose[1]; Pérez-Mejía, Milena[1]; Sandoval-Camacho, Gabriela[1]

[1]*Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.*

Resumen

Introducción

Las enzimas son proteínas que actúan como biocatalizadores al disminuir la energía de activación necesaria para que las reacciones químicas se lleven a cabo, sin consumirse en el proceso y aumentando la velocidad del proceso químico [1]. Su especificidad hacia los sustratos y la regulación de su actividad las convierten en piezas clave tanto en procesos biológicos como en industriales [2]. La diversidad de enzimas que existe actualmente es resultado de la evolución, la cual permitió que estas desarrollaran diferentes mecanismos y funciones con el fin de adaptarse a distintas necesidades biológicas [3].

La actividad enzimática está determinada por factores fisicoquímicos que afectan su estructura y estabilidad, incluyendo la temperatura, pH y concentración de enzima y sustrato. En cuanto a la temperatura, cada enzima tiene un rango óptimo en el cual su actividad es máxima, de modo que un aumento en la temperatura hasta llegar a este intervalo incrementa la actividad. No obstante, valores muy altos pueden causar la inactivación o, inclusive, desnaturalización irreversible de la enzima, mientras que valores muy bajos reducen la velocidad de reacción [4].

Por otro lado, el pH modifica las cargas eléctricas de los aminoácidos que forman el sitio activo y, por ende, la afinidad de la enzima por el sustrato. Desviaciones del rango óptimo de pH causan modificaciones estructurales enzimáticas que reducen su actividad catalítica [1]. En relación a la concentración de sustrato, conforme se aumenta su disponibilidad, la actividad aumenta de manera proporcional hasta alcanzar la saturación de los sitios activos. En este punto, la reacción llega a la velocidad máxima (Vmax). De forma análoga, la cantidad de enzima también eleva la velocidad, siempre que exista suficiente sustrato para ocupar los sitios catalíticos [1].

La amilasa, enzima central de esta práctica, cataliza la hidrólisis del almidón en azúcares más simples como maltosa y glucosa. Su actividad enzimática se puede demostrar mediante pruebas colorimétricas como el uso de Lugol, el cual tiñe de azul oscuro el almidón no hidrolizado, y el reactivo de Benedict, que detecta la presencia de azúcares reductores, productos de la hidrólisis [5]. Este último se debe calentar para que lleve a cabo la reacción y cambia de color - verde, amarillo, naranja o rojo - en función a la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra; de menor a mayor respectivamente. De este

modo, este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad catalítica de la enzima amilasa bajo diferentes condiciones experimentales.

Metodología

Las prácticas se realizaron en el laboratorio de docencia de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del campus central del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), situado en el cantón de Cartago, provincia de Cartago, Costa Rica. La metodología utilizada se basó en los datos especificados en el folleto de laboratorio de Bioquímica (IB-3603), correspondiente a la práctica 5 titulada "Determinación de la actividad catalítica de la enzima amilasa" [6].

1. Actividad enzimática a diferentes concentraciones de amilasa

Previo al montaje experimental se colocó la solución de almidón 1% a incubar a 37°C para que alcanzara esa temperatura al momento de realizar el procedimiento. Se prepararon seis tubos de ensayo marcados como A, B, C, D, E y F, en los cuales se midieron y vertieron los reactivos de acuerdo con la Tabla I. La enzima α-amilasa se añadió al mismo tiempo a todos los tubos lo más rápido posible.

TABLA I

PREPARACIÓN DE MEZCLAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMILASA

Reactivo	A	B	C	D	E	F
Solución de almidón 1% a 37°C	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Solución salina 0,85%	1 ml	0,9 ml	0,8 ml	0,5 ml	0 ml	0 ml
Enzima α-amilasa	0 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml	1 ml	0 ml
Saliva	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	0 ml	1 ml *

Nota: *Cantidad aproximada, sin medición exacta.

Posteriormente, se agitaron los tubos hasta homogenizar la mezcla de almidón y amilasa, y se incubaron por 5 minutos a 37°C, contando el tiempo a partir del momento en que finalizó la agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1 mL de solución de Lugol (compuesta por 20 g de yodo metálico y 40 g de yoduro potásico en un litro de agua destilada) a cada tubo y se observó la aparición o ausencia del color morado. Se anotó el tubo con mejor cantidad de enzima que presentó digestión total de almidón. Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: hidrólisis negativa (color azul, lila o negro, indicando que no se hidrolizó el almidón), hidrolisis parcial (color rojizo) e hidrólisis positiva (color amarillo del Lugol, indicando hidrolisis completa del almidón).

2. Actividad enzimática con diferentes tiempos de reacción

Se prepararon seis tubos de ensayo marcados como 1, 2, 3, 4, 5 y 6 con 0,1 mL de solución de Lugol, o bien 5 gotas en cada uno, y otros dos tubos, marcados como 7 y 8, con 3 mL de reactivo de Benedict. En un tubo aparte, se pipetearon 10 mL de solución de almidón al 1% y se incubó por al menos 5 minutos a 37°C para que alcanzara esa temperatura al momento de iniciar el montaje.

Con base en los resultados del procedimiento anterior, se identificó que el tubo B, al cual se le había añadido 0,1 mL de enzima α-amilasa, fue el que presentó la menor cantidad de enzima con digestión total de almidón. Por lo tanto, se añadió a cada tubo 0,2 mL de enzima α-amilasa, correspondiente al doble de dicha cantidad, y se mezcló lo más rápido posible.

Inmediatamente después de la mezcla, se pipeteo 1 mL de la dilución de almidón en uno de los tubos con Lugol y 1 mL en uno de los tubos con reactivo de Benedict. En intervalos de un minuto, se pipeteó 1 mL de la mezcla de almidón y α-amilasa en los restantes tubos con Lugol. Después de 5 minutos, se pipeteo 1 mL de la mezcla en el segundo tubo con reactivo de Benedict. Posteriormente, se calentaron a ebullición los dos tubos que contenían la mezcla de almidón, enzima y reactivo de Benedict. Finalmente, se anotaron las variaciones de color observadas en los diferentes tubos con Lugol y reactivo de Benedict.

Resultados y discusión

1. Actividad enzimática a diferentes concentraciones de amilasa.

Primero, se evaluó la actividad enzimática a diferentes concentraciones de la α-amilasa con el propósito de observar la relación que existe entre las concentraciones y el grado de hidrólisis del sustrato. La α-amilasa es una enzima hidrolítica que rompe solamente los enlaces glucosídicos α-1,4, siendo el producto de la degradación la maltosa y las dextrinas (permiten la retención de agua en panes). Conviene señalar que la α-amilasa no rompe los enlaces α-1,6 (amilopectina) (Ponce *et al*, 2006). Por último, para visualizar la presencia de almidón se utilizó Lugol, que genera un color violeta-negro y así, observar si ocurre la hidrólisis.

En el tubo A (control) que no tenía enzima, se obtuvo una coloración violeta-negra al agregar el Lugol, así como se aprecia en la figura 1. Esto indica que el almidón permanece intacto por la ausencia de actividad enzimática que degrade el sustrato (Hurtado, 2014). Por otro lado, en los tubos con bajas concentraciones (B, C y D) se observó una coloración violeta-rojiza muy pálida. Lo que indica que sucedió una hidrólisis parcial del almidón, pero la cantidad utilizada no fue suficiente para degradar completamente el almidón y generar una coloración amarilla (Mendoza *et al*, 2017). Es decir, parte del almidón quedó intacto y ocasiona que todavía se vea una coloración violeta, pero al hidrolizarse una fracción del almidón, se generó que cambiará a un color violeta-rojizo tenue. Lo anterior se relaciona con la cinética enzimática,

en el que se postula que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima cuando el sustrato esté en exceso.

En el tubo con mayor concentración, el tubo E. El almidón se hidrolizó completamente, mostrando un color amarillo al agregar Lugol, esto resalta que el sustrato se degradó. Además, evidencia que la cantidad de α-amilasa fue suficiente para catalizar la ruptura de la mayoría de los enlaces α-1,4 del almidón en el tiempo de incubación, generando los productos de degradación (maltosa y dextrinas).

Por otro lado, en el caso del Tubo F (con saliva) también se produjo una coloración amarilla. Pues a pesar de que no tenía α-amilasa, la saliva humana está compuesta de ptialina, que tiene un efecto similar a la α-amilasa (Hernández, 2006). Por lo que las enzimas naturales presentes en el organismo son capaces de degradar almidón de forma eficiente. La comparación entre la enzima comercial y la saliva permite determinar que, aunque las condiciones exactas de las concentraciones no se midieron (en el caso de la saliva), la actividad enzimática natural puede aproximarse a la de la enzima pura.

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos tras incubar una solución de almidón con diferentes concentraciones de α-amilasa, así como con saliva humana en el tubo F. Posteriormente, se añadió Lugol como reactivo indicador de la presencia de almidón no hidrolizado.

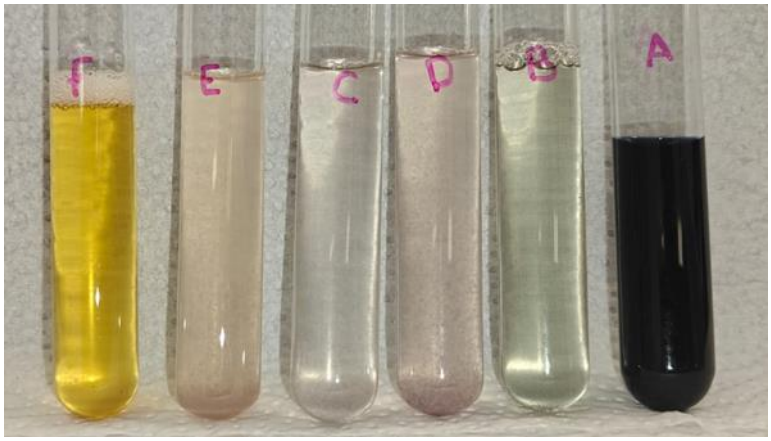

Fig 1. Resultado de la reacción de almidón con Lugol tras tratamiento con distintas concentraciones de α-amilasa y saliva humana (F). Coloración de los tubos A violeta oscuro, B levemente amarillo, C levemente amarilllo, D levemente rojizo, E levemente naranja y F amarillo.

2. Actividad enzimática con diferentes tiempos de reacción

En la Figura 2 se presentan los resultados de la prueba con Lugol en los diferentes tiempos de reacción de la α-amilasa sobre el almidón. Se observa que en el tubo 1 la solución presenta una coloración azul-violeta intensa, indicativa de una alta concentración de almidón sin digerir. En el tubo 2 el color es menos intenso y adquiere un tono marrón-violeta, lo que refleja una hidrólisis parcial. En el tubo 3 se aprecia una tonalidad marrón clara, asociada a una degradación más avanzada del sustrato. El tubo 4 conserva una coloración púrpura, aunque menos intensa que en el tubo 1, señalando la persistencia de

almidón residual. Por su parte, los tubos 5 y 6 muestran coloraciones marrones muy tenues, lo que evidencia una digestión casi completa del almidón en los tiempos finales del ensayo.

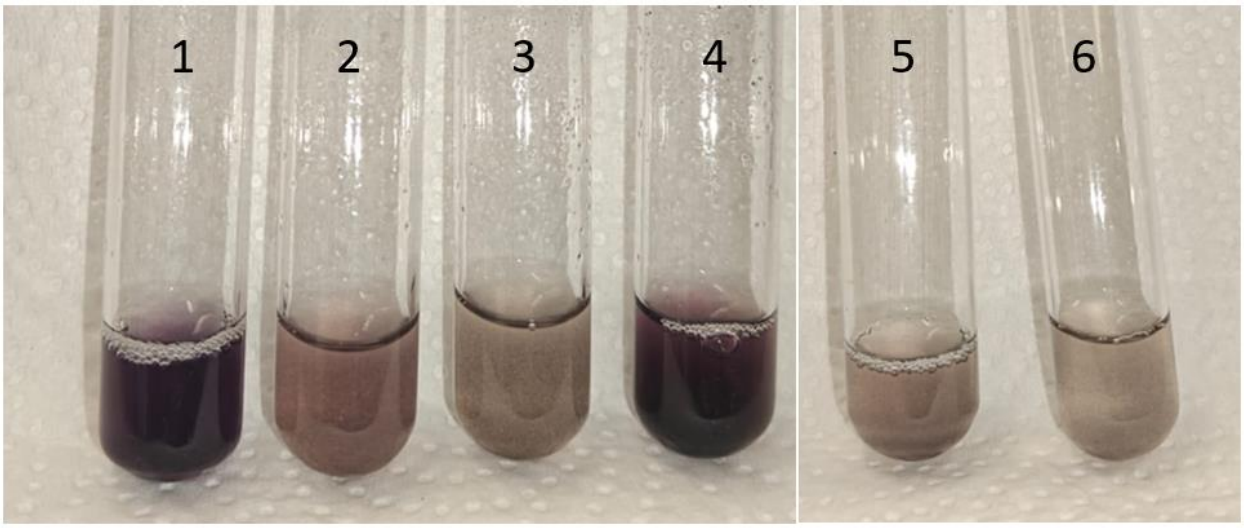

Fig 2. Tubos de ensayo con almidón en reacción con α-amilasa y posterior adición de lugol a diferentes tiempos: tubo 1 (0 min), tubo 2 (1 min), tubo 3 (2 min), tubo 4 (3 min), tubo 5 (4 min) y tubo 6 (5 min). Los tubos 5 y 6 se prepararon de manera independiente debido a un error en el procedimiento inicial.

Los resultados obtenidos al emplear el reactivo de Benedict para detectar la presencia de azúcares reductores liberados durante la hidrólisis enzimática del almidón. En el tubo correspondiente al tiempo inicial (0 minutos), la mezcla conserva una coloración azul, sin evidencia clara de productos reductores, lo que indica la ausencia de hidrólisis significativa al inicio del ensayo. En contraste, el tubo correspondiente al tiempo final (5 minutos) presenta una ligera variación en la tonalidad con presencia de precipitado en el fondo, lo que sugiere la liberación de azúcares reductores como producto de la acción de la α-amilasa sobre el almidón.

Conclusiones

Bibliografía

[1] Y. Gu, “The effect of buffer pH on enzyme activity,” *Theoretical and Natural Science*, vol. 33, no. 1, pp. 144–154, mar. 2024, doi: 10.54254/2753-8818/33/20240893.

[2] M. Vitolo, “Brief review on enzyme activity,” World Journal of Pharmaceutical Research, vol. 9, no. 2, pp. 60-76, feb. 2020, doi: 10.20959/wjpr20202-16660

[3] A. J. M. Ribeiro, I. G. Riziotis, J. D. Tyzack, N. Borkakoti, and J. M. Thornton, “Using mechanism similarity to understand enzyme evolution,” *Biophysical Reviews*, vol. 14, no. 6, pp. 1273–1280, dic. 2022, doi: 10.1007/s12551-022-01022-9.

[4] M. F. Kabir and L.-K. Ju, “On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics,” *Process Biochemistry*, vol. 130, pp. 734–746, may. 2023, doi: 10.1016/j.procbio.2023.05.031.

[5]

[6] Instituto Tecnológico de Costa Rica, *Folleto de laboratorio de bioquímica*. Cartago, Costa Rica, 2025.

Ponce, J., Málaga, J., Huamani, A., & Chuqui, S. (2016). Optimización de la concentración de la α-amilasa y lactosuero en el mejoramiento de las características tecnológicas, nutricionales y sensoriales del pan francés. *Agroindustrial Science*, *6*(2), 185-194.https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6583429

Hurtado Alendes, A. (2014). Biología General (MA155), ciclo 2014-1: Guía de prácticas de laboratorio. https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/313863/LFCCSS-C-01-F04%20Gu%c3%ada%20de%20Laboratorio-Biolog%c3%ada%20General%202014-1a.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Mendoza, J. G. S., Flórez, J. A. F., Contreras, A. L. P., Viloria, K. B., & Lozano, K. P. C. (2017). Análisis morfológico y estructural. *Agroindustria de productos amiláceos II*, 43. https://www.researchgate.net/profile/Jairo-Salcedo/publication/321386088_Agroindustria_de_productos_amilaceos_II_Metodos_y_tecnicas_de_caracterizacion_Agroindustria_de_productos_amilaceos_II_Metodos_y_tecnicas_de_caracterizacion/links/5a2019b5a6fdcc2dc2aec36b/Agroindustria-de-productos-amilaceos-II-Metodos-y-tecnicas-de-caracterizacion-Agroindustria-de-productos-amilaceos-II-Metodos-y-tecnicas-de-caracterizacion.pdf#page=53

Hernández-Gil, I. F. T. (2006). Introducción al aparato digestivo. Cavidad bucal. *HUMANA*, 682. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/58706914/Fisiologia_humana_tresguerres_3_ED_2005.pdf?1738381996=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DFisiologia_humana_tresguerres_3_ED.pdf&Expires=1758606697&Signature=M~ooQD5bIMkHdD7tj6clu~7yklWHVrmUZ6hONIcs3BCjgn0jMzGSkEe-i8JP2P0Wh14McnlTED-iNenBiIyvMIiD6Pc7WBez6xFg4rJa-oYhdkPMyYDs3Z5piFrmowoS2y9OGTVUvgFqawhx8guiO9Af2WgZgOrw6tbdNKM1IHyA1rkGwVvHYA-Ga1U9KdZ4RrbMD1HYs5S53NsOceYexKXY~11iKdeM6Q-esJKHKk~b9fkXsLyKsnuobvsNHl87-ocGJv2fr08o79sbKF~BzKpxh-kPlmw3ER3A69wTWjBidGpqPMXSMsgqg-vIkufF6UIKhBz43SFOnC5GNWVf3Q__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA#page=711